

AM

DNA CAPABLE OF CODING HUMAN NEW K CHANNEL PROTEIN AND ITS FRAGMENT

Patent Number: JP9191882
Publication date: 1997-07-29
Inventor(s): YOKOYAMA MASAHIRO; NISHI YOSHISUKE; MATSUBARA KENICHI; OOKUBO KIMISAKU
Applicant(s): JAPAN TOBACCO INC
Requested Patent: ☒ JP9191882
Application Number: JP19960004726 19960116
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09 ; C07H21/04 ; C12Q1/68
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new DNA, capable of coding a human K \leftrightarrow channel protein, having a specific amino acid sequence and performing an important function in the central nervous system and the peripheral nervous system or a mutant of the human K \leftrightarrow channel protein and useful for identifying a neuron or a neuroblastomatous cell.

SOLUTION: This DNA is a new one capable of coding a human K \leftrightarrow channel protein having an amino acid sequence represented by the formula or a protein, prepared by adding, deleting or substituting one or plural amino acid residues in the amino acid sequence and having biological activities of the human K \leftrightarrow channel protein and is its fragment and useful as a probe or a primer, etc., for identification of a human neuron or a human neuroblastomatous cell, diagnosis, etc., of a neuroblastoma. The DNA is readily obtained from a cDNA library derived from a human neuroblastomatous cell mRNA by carrying out a plaque hybridization method or a polymerase chain reactional(PCR) method using the cDNA library as a template or a reverse transcription-polymerase chain reactional(RT-PCR) method using the human neuroblastomatous cell mRNA as a starting substance.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

Am

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-191882

(43) 公開日 平成9年(1997)7月29日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
// C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平8-4726

(22) 出願日 平成8年(1996)1月16日

(71) 出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(72) 発明者 横山 昌宏

神奈川県横浜市青葉区梅が丘6番2 日本

たばこ産業株式会社生命科学研究所内

(72) 発明者 西 義介

神奈川県横浜市青葉区梅が丘6番2 日本

たばこ産業株式会社生命科学研究所内

(72) 発明者 松原 謙一

大阪府吹田市山田丘1-3 大阪大学 細

胞生体工学センター内

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト新規K⁺チャネル蛋白質をコードするDNAおよびその断片

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、胎児期及び成人の脳において発現するヒトK⁺チャネル蛋白質をコードする、単離された遺伝子を提供する。

【解決手段】 本発明の遺伝子は、ヒト神経芽腫細胞由来のcDNAライブラリーから、プラークハイブリダイゼーション法により調製され、配列番号2に示す塩基配列よりなる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載するアミノ酸配列を有するヒトK⁺ チャネル蛋白質、または上記アミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が付加、欠失若しくは置換されている蛋白質であって、かつヒトK⁺ チャネル蛋白質の生物活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項2】 配列番号1に記載するアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列番号2に記載する塩基配列を有する、請求項2記載のDNA。

【請求項4】 配列番号2、3若しくは4に記載する塩基配列、またはそれらに相補的な塩基配列中の、少なくとも連続する15塩基の配列を有するDNA断片よりなる、神経芽腫診断用のプローブ。

【請求項5】 配列番号5に記載する塩基配列を有するDNA断片よりなる、請求項4に記載のプローブ。

【請求項6】 神経芽腫瘍診断のための複製連鎖反応(PCR)に用いるプライマーであって、配列番号2、3または4に記載されたヒトK⁺ チャネル蛋白質の生物活性を有する蛋白質をコードするDNAの塩基配列から以下の条件を満たす2つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが15-30塩基であること；
- 2) 各領域中のG+Cの割合が40-60%であること；
- 3) 各領域中のA、T、G、Cの分布が部分的に偏らないこと；
- 4) 各領域間の距離が100-1000塩基であること；
- 5) 各領域自身の中または2つの領域間に相補的な配列部分が存在しないこと；そして上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを製造し、さらに必要であれば上記ヒトK⁺ チャネル蛋白質の生物活性を有する蛋白質をコードするDNAの塩基配列に対する結合性を失わないように修飾した上記一本鎖DNAを製造することからなる方法によって製造された、上記プライマー。

【請求項7】 以下の塩基配列：5'-AGTCGGCTGGAGATTCTAC-3' (配列番号5の塩基番号6-25) および5'-AACAAACAAAAGTGGGGTTT-3' (配列番号5の塩基番号165-184の相補配列) を有するDNA断片の組よりなる、請求項6のプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒト新規K⁺ チャネル蛋白質をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】 神経細胞、筋細胞などの興奮性細胞、血管内皮細胞などの非興奮性細胞は、いずれも様々な種類

の細胞膜K⁺ チャネルを所有し、その機能を調節している。K⁺ チャネルは多種多様であり、1つの細胞が数種類のK⁺ チャネルを発現していることも多い。各チャネルの開閉は膜電位、細胞内セカンドメッセンジャーの挙動、細胞の代謝変化、GTP結合蛋白質、蛋白キナーゼ、ホスファターゼ等、様々な機構により複合的に制御、修飾され、細胞膜K⁺ コンダクタンスの微妙な変化は、細胞機能の巧みな調節に重要な役割を果たしている。1987年にショウジョウバエのミュータントであるShakerから、最初の膜電位依存性K⁺ チャネルの遺伝子が単離されて以来(サイエンス 237巻 749頁(1987)、サイエンス 237巻、770頁(1987)、Cell 50巻 405頁(1987)、K⁺ チャネルの分子生物学的研究は爆発的に進められてきた。

【0003】 以上のようにK⁺ チャネル蛋白質は中枢神経系および末梢神経系の神経細胞において、重要な働きをしている。ヒトK⁺ チャネル蛋白質をコードする遺伝子をクローニングし、その構造を明確にすることは脳、神経系の機能を研究する上で非常に重要である。また、得られた遺伝子が組織、あるいは癌細胞特異的な発現パターンを示すものであるなら、その遺伝子断片が組織や細胞を認識する、あるいは癌の診断に有効な遺伝子マーカーにもなりうる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、胎児期及び成人の脳において発現するヒトK⁺ チャネル蛋白質をコードする遺伝子を提供することにある。本発明はさらに、神経芽腫細胞において発現するヒトK⁺ チャネル蛋白質を提供する。

【0005】 さらに本発明は、ヒトの神経細胞および神経芽腫細胞を同定するためのプローブまたはプライマーとして有用なDNA断片を提供することも目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、ヒト新規K⁺ チャネル蛋白質をコードするcDNAを単離し、その塩基配列を決定して、そのアミノ酸配列を推定した。その結果、ヒト新規K⁺ チャネル蛋白質は、後掲の配列表において配列番号1で表されるアミノ酸配列を有することが判明した。

【0007】 以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】 ヒト新規K⁺ チャネル蛋白質遺伝子

本発明のヒト新規K⁺ チャネル蛋白質遺伝子は、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が付加、欠如若しくは置換されており、且つヒト新規K⁺ チャネル蛋白質をコードするDNAである。本発明のDNAがヒト新規K⁺ チャネル蛋白質の生物活性をコードする事実は、後掲の実施例中の(7)に説明した理由により確認された。

【0009】本発明により決定されたヒト新規K⁺ チャネル蛋白質遺伝子をコードする遺伝子の塩基配列は、配列表の配列番号2にそれがコードする推定アミノ酸配列とともに示されている。この配列から明らかなように、このcDNAは、塩基番号1から1182の合計1182塩基対からなる。塩基番号1から3は翻訳開始遺伝暗号に相当し、塩基番号1180から1182までは翻訳停止遺伝暗号に相当する。この塩基番号1180ないし1182の***はTGA、TAAまたはTAGのいずれでも良い。配列番号1は配列番号2に示す塩基配列から推定されるアミノ酸を示したものである。

【0010】従って、本発明の遺伝子は下記実施例に記載されているように、ヒト神経芽腫細胞mRNA由来のcDNAライブラリーから、例えばブランクハイブリダイゼーション法を利用して得ることもできるが、本発明により決定されたDNAの塩基配列に基づいて、ヒト神経芽腫細胞mRNA由来のcDNAライブラリーを鋳型とするPCR法により、又はヒト神経芽腫細胞mRNAを出発物質とするRT-PCR法により容易に調製することもできる。このように調製したヒト新規K⁺ チャネル蛋白質 cDNAを利用して下記の方法により変異体を調製することもできる。

【0011】1つのアミノ酸をコードするコドンには複数存在するので、コードされるアミノ酸配列が同じであれば、どのような塩基配列のDNAも本発明の範囲に含まれる。配列番号2に示される推定アミノ酸配列を抜き出して示したものが配列番号1に示すアミノ酸配列である。従って、本発明には配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするいずれのDNAも含まれる。

【0012】さらに、一般に生理活性を有するペプチドのアミノ酸配列が多少変更された場合、すなわち、該アミノ酸配列の中の1又は複数のアミノ酸が置換され、若しくは欠失し又は1又は複数のアミノ酸が付加された場合でも該ペプチドの生理活性が維持される場合があることは周知の事実である。したがって、配列番号1で示されるアミノ酸配列において、このような修飾が加えられ、かつヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質の変異体も本発明の範囲内である。さらに、当該変異体蛋白質をコードするDNAも本発明の範囲に含まれる。

【0013】アミノ酸の付加、欠失又は置換による変異体は、例えばそれをコードするDNAに、例えば、周知技術である部位特異的変異誘発（例えばNucleic Acid Research, Vol.10, No.20, p6487-6500, 1982）を施すことにより実施することができる。本明細書において「1又は複数のアミノ酸」とは、部位特異的変異誘発法により付加、欠失又は置換できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0014】部位特異的変異誘発は、例えば、所望の変異である特定の不一致の他は変異を受けるべき一本鎖ファージDNAに相補的な合成オリゴヌクレオチドプライ

マーを用いて次のように行うことができる。すなわち、プライマーとして上記合成オリゴヌクレオチドを用いてファージに相補的な鎖を合成させ、得られた二重鎖DNAで宿主細菌を形質転換する。形質転換された細菌の培養物を寒天にプレートし、ファージを含有する単一細胞からブランクを形成せしめる。そうすると、理論的には、50%の新コロニーが単鎖として変異を有するファージを含有し、残りの50%が元の配列を有する。得られたブランクを上記所望の変異を有するDNAと完全に一致するものとはハイブリッド形成するが、もとの鎖を有する不一致のものはハイブリッド形成しない温度において、キナーゼ処理された合成プロンプとハイブリッド形成せしめる。次に該プロンプとハイブリッド形成するブランクを拾い、培養し、DNAを回収する。

【0015】なお、酵素のアミノ酸配列に、酵素活性を喪失せしめない1又は複数のアミノ酸の置換、欠失又は挿入の方法としては、上記の部位特異的変異誘発の他にも、遺伝子を変異原で処理する方法及び遺伝子を選択的に開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去、付加、又は置換し、次いで連結する方法もある。なお、上記した本発明のDNAの両端、すなわち翻訳開始暗号および翻訳停止暗号は、それぞれ任意のDNA断片と結合することができる。このDNA断片の塩基配列及びサイズは重要ではなく、バクテリア等の有する核外遺伝子と連結するための適当なDNA断片であればよい。例えば下記実施例においては翻訳開始暗号は配列番号3で表される塩基配列を有するDNA断片と翻訳停止暗号は配列番号4で表される塩基配列を有するDNA断片とそれぞれ結合されている。

【0016】変異体は保存的に置換された配列を含んでいてもよく、これは、特定のアミノ酸残基が類似の物理化学的特徴を有する残基によって置き換えられていてもよいことを意味している。保存的置換の非限定的な例には、Ile、Val、Leu又はAla相互の置換の如き脂肪族基含有アミノ酸残基の間の置換、又はLysとArg間の如き極性基含有アミノ酸残基の間の置換が含まれる。

【0017】本発明の範囲内に入る塩基配列には、温和な又は苛酷なストリンジェンシーの条件下で本明細書に開示したヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質の塩基配列にハイブリダイズし、かつ生物学的に活性なヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質をコードする単離されたDNA及びRNAが含まれる。温和なストリンジェンシーによるハイブリダイゼーションの条件は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Vol.1, p. 1. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)に記載された条件を意味する。Sambrookらにより定義されているように、温和なストリンジェンシーの条件には、5×SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH8.0)の前洗浄用溶液と約55℃, 5×SSC

C、一晚のハイブリダイゼーション条件の使用が含まれる。苛酷なストリンジェンシーの条件には、より高温のハイブリダイゼーションと洗浄が含まれる。その際、プローブの長さ等の各種要因に応じて温度及び洗浄溶液の塩濃度は適宜調節される。

【0018】ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子の分化、発生の研究試薬としての使用

ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子のDNAは、ヒト臓器、細胞における発現パターンの違いを比較するために使用することができる。これにより、ヒト臓器、細胞の分化、発生の研究が促進される。例えば、本発明者らは、ノーザン解析の結果からヒト新規K⁺チャネル蛋白質はヒト肝臓癌細胞株、ヒト子宮頸癌細胞株、ヒト成人の脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、心臓には発現しておらず、ヒト神経芽腫細胞およびヒト成人の脳だけに発現しているという結果を得ている。

【0019】ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子のプローブとしての使用

本発明は、上記のようにヒト新規K⁺チャネル様蛋白質がヒト神経芽腫細胞、ヒト成人の脳および睾丸にだけ発現しているという発見に基づき、ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子の配列に特異的にハイブリダイズするDNA断片を適当な標識で標識して、ヒト神経芽腫細胞およびヒト成人の脳の同定を行う技術を提供する。

【0020】プローブは配列番号2、3または4のいずれの配列に基づいて設計してもよい。その長さは少なくとも連続する15塩基以上であることが好ましいが、15塩基以上であれば、各配列番号の全長まであるいは配列番号3、2および4の合計までのいずれの長さであってもよい。例えばプローブとして使用可能な部分は、配列番号5に相当する部分である。プローブは一本鎖でも二本鎖でもよいが少なくとも使用時には一本鎖となる。さらに、上述したように塩基配列2から選定されたDNA断片プローブを、ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子に特異的にハイブリダイズする性質を失わないように、塩基の追加、削除、変更等により修飾した配列も本発明に含まれる。

【0021】限定されるわけではないが、プローブは本明細書に開示された方法により得られた単離されたヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子のcDNA断片を、適当な制限酵素によって切断することにより調製できる。または、ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子を含む試料を用いてPCR反応を行うことによって、プローブを調製することもできる。あるいは、市販のDNA合成機（例えば、パーキンエルマー社製）により慣用された方法により、プローブとなる一本鎖DNAを合成することもできる。

【0022】プローブは慣用された方法により、例えば、放射性同位元素、検出可能な酵素等により標識できる。例えば³²Pを用いる場合、一般にヒト新規K⁺チャ

ネル様蛋白質遺伝子のcDNA断片を使用する場合は、ランダムプライミングラベルにより標識し、また、合成プライマーを使用する場合はリン酸化酵素により5'末端標識すると都合がよい。ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質を含むと予想される試料と、上記本発明のプローブとのハイブリダイゼーションは、慣用された方法により行うことができる。一般には、中程度のハイブリダイゼーション強度（42℃～50℃でハイブリダイゼーションを行い、0.1×SSCで洗浄）によって行う。

【0023】例えば、患者の骨髄液から抽出したmRNAを電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーしたものとプローブとのハイブリダイゼーションがオートラジオグラフ等により検出された場合、当該試料は神経芽腫細胞を含有すると診断される。神経芽腫細胞は小児の副腎髄質と全身の交感神経節から発生する癌であり、骨に転移が起こりやすいのが特徴である。小児癌の検査は、これまで尿中に含まれる神経芽細胞の検出によって行っていたが、尿中に神経芽細胞が排出されない場合もある。したがって、骨髄液中に神経芽腫細胞が含まれるか否かを調べることによって、小児癌発見の精度を上げることが可能である。

【0024】ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子のPCRプライマーとしての使用

ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子の配列又はその相補鎖の一部とハイブリダイズするDNA断片は、PCRのプライマーとして用いることもできる。このようなDNA断片の組をプライマーとしてPCRを行い、試料中のmRNAから調製されたcDNAが増幅されるか否かを調べることにより、ヒト神経芽腫細胞およびヒト成人の脳の存在を調べることができる。

【0025】本発明のプライマーは配列番号2、3または4から以下の条件を満たすように2つ選定することができる。

- 1) プライマーの長さが15-30塩基、好ましくは、20-25塩基であること；
- 2) プライマーの中のG（グアニン）+C（シトシン）の割合が40-60%、好ましくは45-55%、より好ましくは約50%であること；
- 3) プライマーの配列に含まれるA（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、C（シトシン）の分布が部分的に偏らないこと、例えば、GTが繰り返し分布するような領域は特異性が低いと考えられるのでプライマーとして採用できない。

【0027】4) 選定される2つのプライマーに対応するヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子の塩基配列上の距離が100-1000塩基、好ましくは、150-500塩基、より好ましくは15-300塩基であること；および

5) 各プライマー自身の内部または2つのプライマー間に相補的な配列部分が存在しないこと。

【0028】好ましいプライマーの例は、以下の通りである。

【0029】5'側プライマー: 5'-AGTCGGCCTGGAGATTCTAC-3' (配列番号5の塩基番号6-25)

3'側プライマー: 5'-AACAAACAAAAAGTGGGGTTT-3' (配列番号5の塩基番号165-184の相補配列)

これらのプライマーは、二つを組にして用いてもよく、それぞれを他の適当なDNA断片と組にして用いてもよい。さらに、上記の好ましいプライマーをヒトAMYに特異的にハイブリダイズする性質を失わないように、塩基の追加、削除、変更等により修飾した配列もPCRプライマーとして使用可能である。

【0030】プライマーの配列が選定されれば市販のDNA合成機(例えば、パーキンエルマー社製)により慣用された方法により、プライマーとなる一本鎖DNAを合成できる。プライマーは一本鎖でも二本鎖でもよいが使用時には一本鎖となる。

【0031】さらに、上述した選定条件を満たすように配列番号2、3または4から選択した塩基配列を、ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質に特異的にハイブリダイズする性質を失わないように、塩基の追加、削除、変更等により修飾した配列も本発明の範囲に含まれる。

【0032】PCRのDNA鎖合成反応に用いるポリメラーゼは熱耐性ポリメラーゼ(典型的にはTaqポリメラーゼ)を使用するのが好ましい。PCR反応用のポリメラーゼ、デオキシリボ核酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、反応溶液等は必要であればキットとして市販されている。

【0033】PCR反応は、試料中のmRNAから調製されたcDNAとプライマーとのアニーリング、ポリメラーゼ反応および熱変性の3工程からなる一連の複製反応を1サイクルとする。必ずしも以下の条件に拘束されるわけではないが、本発明においては、アニーリングは35~70℃、好ましくは45~55℃、より好ましくは約50℃で、20秒から2分、好ましくは約1分行う。ポリメラーゼ反応は、60~80℃、好ましくは70~75℃で、1~3分行う。熱変性は90~95℃で、30秒~1分行う。サイクル数は、25~35回とするのが好ましい。PCR反応は、市販のPCR用自動機器(例えば、パーキンエルマー社製)を用いて行うことができる。

【0034】PCR反応の結果、例えば、患者の骨髄液のmRNAから調製したcDNAの中にヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子が存在する場合、使用した2種類のプライマーがアニーリングした鋳型DNAの間の領域が増幅される。反応後の溶液をアガロースやポリアクリルアミド等の媒体中で電気泳動すると、使用したプライマーから予想される長さのバンドを検出することができ

る。このようにしてバンドが検出される場合、試料中に神経芽腫細胞が存在すると診断される。

【0035】組換えヒト新規K⁺チャネル様蛋白質の製造

さらに、本発明はヒト新規K⁺チャネル様蛋白質 cDNAを含む発現ベクター、及びこれら発現ベクターを含有する宿主細胞をヒト新規K⁺チャネル様蛋白質の発現に適する条件下で培養して、その発現されたヒト新規K⁺チャネル様蛋白質を回収することにより、組換えヒト新規K⁺チャネル様蛋白質を製造する方法も提供する。

【0036】本発明の組換えヒト新規K⁺チャネル様蛋白質を製造するためには、使用する宿主細胞に応じて選ばれた発現ベクターに、哺乳動物、微生物、ウィルス、又は昆虫遺伝子等から誘導された、適当な転写又は翻訳調節ヌクレオチド配列に連結したヒト新規K⁺チャネル様蛋白質のDNA配列を挿入する。調節配列の例として、転写プロモーター、オペレーター、又はエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、及び転写及び翻訳の開始及び終結を制御する適切な配列が挙げられる。加えて、ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質遺伝子に本来存在しない適切なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクター内に組み込んでもよい。

【0037】ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質の発現に適する宿主細胞には、原核細胞、酵母又は高等真核細胞が含まれる。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物細胞宿主で用いる適切なクローニング及び発現ベクターは、例えば、Pouwels ら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, (1985)に記載されている。

【0038】原核生物には、グラム陰性又はグラム陽性菌、例えば、大腸菌又は枯草菌が含まれる。大腸菌のような原核細胞内では、ヒト新規K⁺チャネル様蛋白質は、原核細胞内でも組換えポリペプチドの発現を容易にするためにN末端メチオニン残基を含んでもよい。このN末端Metは、発現後に組換えヒト新規K⁺チャネル様蛋白質から切り離すことができる。

【0039】原核宿主細胞内で用いる発現ベクターは、一般に1又は2以上の表現型選択可能マーカー遺伝子を含む。表現型選択可能マーカー遺伝子は、例えば、抗生物質耐性を付与するか又は独立栄養要求性を付与する遺伝子である。原核宿主細胞に適する発現ベクターの例には、pBR322(ATCC37017)の如き市販のプラスミドまたはそれから誘導されるものが含まれる。pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含むので、形質転換細胞を同定するのが簡単である。適切なプロモーターおよびヒト新規K⁺チャネル様蛋白質 DNA配列が、このpBR322ベクター内に挿入される。他の市販のベクターには、例えば、pKK223-3(スエーデン、ウプサラのPharmacia Fine Chemicals)及びpGEM1(米国、ウィスコンシン州、マジソンのPromega Biotec)

が含まれる。

【0040】原核宿主細胞用の発現ベクターに普通に用いられるプロモーター配列には、 β -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトースプロモーター（Chang ら, *Nature* 275:615, 1978; 及び Goeddel ら, *Nature* 281:544, 1979）等が含まれる。特に有用な原核宿主細胞発現系は、ファージ λ P_Lプロモーター及びcI 857ts 不耐熱性レプレッサー配列を用いる。 λ P_Lプロモーターの誘導体を取り込んでいるアメリカン・タイプ・ガリチャー・コレクションから入手できるプラスミドベクターには、プラスミドpHUB2（大腸菌株JMB9（ATCC37092）内に存する）及びpPLc28（大腸菌株RP1（ATCC53082）内に存する）が含まれる。

【0041】また、ヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質を酵母宿主細胞内で発現させてもよい。好ましくはサッカロミセス属（例えば、S. セレビシエ）を用いるが、ピキア（*Pichia*）又はクルイベロミセス（*Kluyveromyces*）の如き他の酵母の属も用いてもよい。酵母ベクターは、2 μ 酵母プラスミドからの複製起点の配列、自律複製配列（ARS）、プロモーター領域、ポリアダニル化のための配列、転写終結のための配列、及び選択可能なマーカー遺伝子を含有することが多い。酵母 α 因子リーダー配列を用いて、ヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質の分泌を行わせることもできる。酵母宿主からの組換えポリペプチドの分泌を促進するのに適する他のリーダー配列も知られている。酵母を形質転換する方法は、例えば Hinnen ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978に記載されている。

【0042】哺乳動物又は昆虫宿主細胞培養系を用いて、組換えヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質を発現することもできる。哺乳動物起源の株化細胞系も用いることができる。哺乳動物宿主細胞発現ベクターのための転写及び翻訳制御配列は、ウィルスゲノムから得ることができる。普通に用いられるプロモーター配列及びエンハンサー配列は、ポリオーマウィルス、アデノウィルス2等から誘導される。SV40ウィルスゲノム、例えば、SV40起点、初期及び後期プロモーター、エンハンサー、スプライス部位、及びポリアダニル化部位から誘導されるDNA配列を用いて、哺乳動物宿主細胞内での構造遺伝子配列の発現のための他の遺伝子要素を与えてもよい。哺乳動物宿主細胞内で用いるための発現ベクターは、例えば Okayama 及び Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983)の方法で構築することができる。

【0043】本発明のヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質を産生する1つの方法は、ヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質をコードするDNA配列を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、ヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質が発現する条件下で培養することを含む。次いで、用いた発現系に応じて、ヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質を培養培地

又は細胞抽出液から回収する。組換えヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質を精製する操作は、用いた宿主細胞の型及びヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質が培養培地中に分泌されるかどうかといった要因に従って適宜選択する。

【0044】本発明のヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質は、ヒトの中枢神経系および神経内分泌系の研究のための貴重な試薬になると期待される。さらに、そのような研究の結果ヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質の作用が明らかになれば、ヒト新規K⁺ チャネル様蛋白質自体、あるいはそのインヒビターを神経系疾患の治療薬として利用できるものと期待される。

【0045】

【実施例】以下、この発明を実施例により説明する。以下の実施例は、後掲の配列表において配列番号2で表される塩基配列に、塩基番号1の塩基に配列番号3で表される配列を有する塩基対が、また塩基番号1182の塩基に配列番号4で表される配列を有する塩基対がそれぞれ結合した塩基配列を有するDNAの製造法を説明するものである。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではないことは明らかである。なお、下記実施例において、各操作は、特に明示がない限り、マニアティス（Maniatis）ら、[モレキュラー・クローニング・ラボラトリーマニュアル 第2版（1989）、コールド・スプリング・ハーバー]記載の方法により行った。また、制限酵素は市販のものを用い、その具体的な使用法は市販品の指示書に従った。さらに、使用した神経芽腫細胞CHP134、LA-N-1、LA-N-2、LA-N-5、MC-NB-1、NB69、およびヒト肝臓癌細胞株HepG2は、理化学研究所細胞開発銀行より入手可能であり、HeLaおよびIMR32は、財団法人がん研究振興財団のJapanese Cancer Research Resources Bankより入手可能である。

【0046】(1) ヒト神経芽腫細胞CHP134のmRNAの調製

約10⁷個のヒト神経芽腫細胞CHP134に、18mlのSolution D液（4M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム、0.5% サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール）を加え、ラバーポリスマンで細胞をはがし溶解させた後、素早くホモジナイズした。得られたホモジネートを50mlの遠心管に移し、2M 酢酸ナトリウム（pH4）を2ml加え、混和した。次に、水飽和フェノールを20ml加え、混和した。そして最後に、クロロホルムを5ml加え混和した後、15分氷冷した。その後、4℃で4000×g、1時間遠心した。遠心後、水層を別の遠心管に移し、その水層に32mlのエタノールを加え、混和した。-20℃に1時間置くことによりRNAを沈殿させた。遠心分離により回収したRNAは、80%エタノールで洗浄後、真空乾燥させ、滅菌蒸留水に溶解し

た。次に得られたRNA水溶液を、以下の手順で処理してポリ(A)を有するmRNAを分離した。すなわち、滅菌蒸留水に溶解したRNAに、等量の2×elution buffer (20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0.2% SDS)と、宝酒造株式会社から市販されているOligotex-dT30溶液を2倍量加え、攪拌した。攪拌後、65℃で5分間熱処理を施し、3分間氷冷した。氷冷後、5M NaCl溶液を1/10量加え、37℃で10分間放置し、遠心分離によりmRNAと結合しているOligotex-dT30を回収した。回収したOligotex-dT30は、washing buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1M NaCl)により洗浄した。洗浄後、滅菌蒸留水を加え、65℃で5分間熱処理を施し、mRNAを溶出した。遠心分離により、溶出したmRNAを単離し、エタノール沈殿により回収した。回収したmRNAは、80%エタノールで洗浄後、真空乾燥させ、滅菌蒸留水に溶解した。このmRNAを用いて以下のcDNA合成を行った。

【0047】(2) 3' directed cDNAライブラリーの作製

大久保らの方法(Dna Seq. 2 (1991) 137-144)により、上記のヒト神経芽腫細胞CHP134のmRNAを用いて、pUC119をベクターとする3' directed cDNAライブラリーを作製した。この方法により、pUC119のBamHIサイトとPst Iサイトの間に、cDNAの3'末端の配列が挿入したプラスミドライブラリーを作製した。

【0048】このライブラリーより無作為に約1300クローンのcDNA塩基配列を解析した。この解析したクローンの中から、ヒト神経芽腫細胞CHP134において特異的に発現していると考えられるクローンを選択した。選択に際しては、大阪大学細胞生体工学センターの松原謙一教授の研究室において作製された(Gene 135 (1993) 265-274) 遺伝子発現情報データベース(Body expression map of human genes)を利用した。

【0049】(3) ヒト細胞株およびヒト各臓器におけるGS008740遺伝子の発現の確認

ヒト神経芽腫細胞CHP134において特異的に発現していると考えられるクローンの1つとして、GS008740遺伝子を選択した。GS008740遺伝子の塩基配列を後掲の配列表において配列番号5として示す。ノーザン解析法を利用して、GS008740遺伝子のヒト細胞株およびヒト各臓器における発現を解析した。ヒト細胞株の解析として、ヒト神経芽腫細胞株CHP134、LA-N-1、LA-N-2、LA-N-5、MC-NB-1、NB69、IMR32、ヒト肝臓癌細胞株HepG2、ヒト子宮頸癌細胞株HeLa由来の全RNA30μgをア

ガロースゲルで電気泳動後、トランスファーしたナイロンメンブレンを作製した。そして、ヒト脳、脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、心臓由来のmRNA各2μgをアガロースゲルで電気泳動後、トランスファーしたナイロンメンブレン(クローンテック社製)を購入して解析に利用した。これらのナイロンメンブレンをハイブリバックに入れ、10mlのハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSPE、50%ホルムアミド、5×Denhardt's、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム、40μg/mlサケ精子DNA)を加えて42℃、1時間反応させた。

【0050】プローブの³²P標識は、pUC119のBamHIサイトとPst Iサイトの間に挿入されたGS008740遺伝子のPCR断片を鋳型として、マルチプライマーキット(アマシャム社製)を用いて行った。この³²P標識したプローブを上記反応液に加えてさらに14時間以上ハイブリダイゼーション反応を行った。その後、フィルターを0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む500mlの2×SSCにより50℃で2回、20分間ずつ洗い、さらに0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む500mlの0.1×SSCにより50℃で2回、20分間ずつ洗った。その後、-70℃でインテンシファイスクリーンを用いて2日間オートラジオグラフィーを行った。結果は図1に示す。なお、上記PCRにおいて使用したプライマーの塩基配列は次のとおりである。

【0051】5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3'

GS008740遺伝子はヒト肝臓癌細胞株、ヒト子宮頸癌細胞株、ヒト成人の脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、心臓には発現しておらず、ヒト神経芽腫細胞およびヒト成人の脳だけに発現していることが分かる。GS008740遺伝子はヒト神経芽腫細胞およびヒト成人の脳の遺伝子マーカーとして利用することが考えられる。

【0052】(4) ヒト神経芽腫細胞IMR32のmRNAの調製

GS008740遺伝子の全長cDNAを得るために、cDNAライブラリーを作製した。まず、ヒト神経芽腫細胞IMR32のmRNAの調製をおこなった。約10⁷個のヒト神経芽腫細胞IMR32に、18mlのSolution D液(4M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム、0.5%サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール)を加え、ラバーボリスmanで細胞をはがし溶解させた後、素早くホモジナイズした。得られたホモジネートを50mlの遠心管に移し、2M 酢酸ナトリウム(pH4)を2ml加え、混和した。次に、水飽和フェノールを20ml加え、混和した。そして最後に、クロロホルムを5ml加え混和した後、15分氷冷した。その後、4℃で4000×g、1時間遠心した。遠心後、水層を別の遠心管に移し、その水層に32mlのエタノールを加え、混和した。-2

0℃に1時間置くことによりRNAを沈殿させた。遠心分離により回収したRNAは、80%エタノールで洗浄後、真空乾燥させ、滅菌蒸留水に溶解した。次に得られたRNA水溶液を、以下の手順で処理してポリ(A)を有するmRNAを分離した。すなわち、滅菌蒸留水に溶解したRNAに、等量の2×elution buffer (20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0.2% SDS)と、宝酒造株式会社から市販されているOligotex-dT30溶液を2倍量加え、攪拌した。攪拌後、65℃で5分間熱処理を施し、3分間氷冷した。氷冷後、5M NaCl溶液を1/10量加え、37℃で10分間放置し、遠心分離によりmRNAと結合しているOligotex-dT30を回収した。回収したOligotex-dT30は、washing buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1M NaCl)により洗浄した。洗浄後、滅菌蒸留水を加え、65℃で5分間熱処理を施し、mRNAを溶出した。遠心分離により、溶出したmRNAを単離し、エタノール沈殿により回収した。回収したmRNAは、80%エタノールで洗浄後、真空乾燥させ、滅菌蒸留水に溶解した。このmRNAを用いて以下のcDNA合成を行った。

【0053】(5) cDNAライブラリーの作製
調製したmRNAからのcDNA合成は、GIBCO BRL社から市販されている逆転写酵素SUPER SCRIPT IIを用い、製品に添付されているプロトコールに従って行った。逆転写酵素により、mRNAに相補的なcDNAを合成した後、リボヌクレアーゼHで、RNA鎖にニックとギャップを入れ、これを大腸菌DNAリガーゼを用いて修復合成することにより、RNA鎖をcDNA鎖に置換した。最後に、T4 DNAポリメラーゼにより、cDNA鎖の両端を平滑化した。続いて、アマシャム社から市販されているλMOSS1.0 xライブラリーシステムを用いて、cDNAライブラリーを作製した。方法は、すべて製品に添付されているプロトコールに従って行った。すなわち、まず、合成cDNAの両端にEcoRIアダプターを付加し、これと予めEcoRIで切断処理が施されているλMOSS1.0 xアームとを連結した。その後、インビトロパッケージを行い、大腸菌ER株(製品に付属)に感染させることにより、cDNAライブラリーを作製した。

【0054】(6) GS008740遺伝子の全長cDNAクローンの選抜

上記(5)において調製したcDNAライブラリーのうち、約10万個のファージ群を大腸菌ER株に吸収させて寒天プレートにまき、37℃で12時間培養した。その寒天上にナイロンメンブレンフィルターを置き、1分間放置してファージをフィルターに吸着させた後、フィルターを寒天から剥がし、変性液(0.5M NaO

H, 1.5M NaCl)中で5分間変性処理を行った。ペーパータオル上で十分変性液を除いた後、中和液(3M 酢酸ナトリウム pH5.5)中で5分間中和反応をし、紫外線照射をおこない、続いて2×SSC(1×SSCは0.15M塩化ナトリウムを含む15mMクエン酸ナトリウム塩酸緩衝液、pH7)中で30分間洗浄した。このフィルターをハイブリダイゼーション液(7%ポリエチレングリコール6000、10%ドデシル硫酸ナトリウム)に浸し、65℃にて1時間反応させた。

【0055】プローブの³²P標識は、上記(3)において調製したGS008740遺伝子のPCR断片を鋳型として、マルチプライマーキット(アマシャム社製)を用いて行った。この³²P標識したプローブを上記反応液に加えてさらに14時間以上ハイブリダイゼーション反応を行った。その後、フィルターを0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む500mlの2×SSCにより65℃で2回、20分間ずつ洗い、さらに0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む500mlの0.1×SSCにより65℃で2回、20分間ずつ洗った。その後、-70℃でインテンシファイスクリーンを用いて2日間オートラジオグラフィーを行った。

【0056】プローブとして用いたGS008740遺伝子の配列を含むcDNAが挿入されているファージDNAには、³²P標識したDNAプローブが結合する。したがってナイロンメンブレンフィルターに吸着されたファージDNAのブランクに相当する部分はX線フィルムに黒点を生じる。この黒点を生じたブランクのファージを寒天プレートから単離し、約1.5kbpの長さのcDNAが挿入されているクローンを得た。

【0057】得られたファージクローンから大腸菌BM株(アマシャム社製品に付属)を用いた方法により、インサートを含むプラスミドを回収した。この際の詳細な方法は、すべてアマシャム社のプロトコールに従った。

【0058】(7) cDNAインサートの全塩基配列の決定

cDNAインサートの全塩基配列をダイデオキシターミネーターキット(ABI社製)を用いてプライマーウォーキング法により決定した。決定した全塩基配列を後掲の配列表において配列番号2、3および4として示す。ここで配列番号3で表される配列は配列番号2で表される配列の塩基番号1の塩基に結合しており、配列番号4で表される配列は配列番号2で表される配列の塩基番号1182の塩基に結合している。クローンpHKCは、1448塩基対を挿入DNAとして含み、翻訳開始遺伝暗号ATGから翻訳停止遺伝暗号TAGまでの1182塩基対を連続した最も大きなオープンリーディングフレームとして持っていた。配列番号2で表されるDNA塩基配列から誘導されるアミノ酸配列を配列番号1として配列表に示した。

【0059】クローンpHKCに挿入されたDNA塩基配列から誘導されるアミノ酸配列は、既知のK⁺チャネルのアミノ酸配列と一部相同性を示した。最も相同性の高かった領域はK⁺チャネルのH5領域 (Hydrophobic segment 5) であり、この領域はK⁺チャネルの孔 (ポア) を形成する部分で、重要な領域である (Neuron 5巻 767頁 (1990)、サイエンス 251巻 939頁 (1991)、サイエンス 251巻 942頁 (1991)、Nature 349巻 700頁 (1991))。このH5領域にはコンセンサス配列と呼ばれるポア形成に影響のある配列があり (Biophys. J., vol. 66, 1061-1067 (1994))、クローンpHKCに挿入されたDNA配列から誘導されるアミノ酸配列は、コンセンサス配列を保持しており、またアミノ酸配列は100%一致した。また、クローンpHKCに挿入されたDNA塩基配列から誘導されるアミノ酸配列は、J. Mol. Biol. vol. 157, 105 (1982) のHydrophathy analysisによれば、膜電位依存性K⁺チャネルの構造上の特徴であることが知られている6つの膜貫通部位S1、S2、S3、S4、S5およびS6セグメントを持ち、さらにこのS4セグメントは、図2に示すとおり、204番目のグルタミン残基を除けば、正電荷を帯びたアルギニンまたはリジン残基が3残基おきに存在するK⁺チャネル蛋白質に特徴的な一次構造をとっている。このような一次構造は、電位センサーの機能に関与していると考えられてい

配列

Met	Val	Gln	Lys	Ser	Arg	Asn	Gly	Gly	Val	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly
1					5				10					15	
Glu	Lys	Lys	Leu	Lys	Val	Gly	Phe	Val	Gly	Leu	Asp	Pro	Gly	Ala	Pro
			20					25					30		
Asp	Ser	Thr	Arg	Asp	Gly	Ala	Leu	Leu	Ile	Ala	Gly	Ser	Glu	Ala	Pro
			35				40				45				
Lys	Arg	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Lys	Pro	Arg	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala
			50				55				60				
Gly	Lys	Pro	Pro	Lys	Arg	Asn	Ala	Phe	Tyr	Arg	Lys	Leu	Gln	Asn	Phe
			65			70				75				80	
Leu	Tyr	Asn	Val	Leu	Glu	Arg	Pro	Arg	Gly	Trp	Ala	Phe	Ile	Tyr	His
			85						90				95		
Ala	Tyr	Val	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Ser	Cys	Leu	Val	Leu	Ser	Val	Phe
			100						105				110		
Ser	Thr	Ile	Lys	Glu	Tyr	Glu	Lys	Ser	Ser	Glu	Gly	Ala	Leu	Tyr	Ile
			115				120					125			
Leu	Glu	Ile	Val	Thr	Ile	Val	Val	Phe	Gly	Val	Glu	Tyr	Phe	Val	Arg
			130				135				140				
Ile	Trp	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Cys	Arg	Tyr	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Arg
			145				150				155			160	
Leu	Lys	Phe	Ala	Arg	Lys	Pro	Phe	Cys	Val	Ile	Asp	Ile	Met	Val	Leu
							165							170	
															175

る (Nature 349巻305頁 (1991))。S4セグメント内の正電荷を帯びたアミノ酸残基は、チャネル活性化の際に観察されるゲート電流に関与することも示されている (Nature 353巻 752頁 (1991))。またS4セグメントのアミノ酸配列は、電位依存性K⁺チャネルがチャネル構造を形成する上で重要な核 (core) になるとも考えられている (Nature 345巻 672頁 (1991))。これらのことからクローンpHKCは新規の膜電位依存性K⁺チャネルをコードする遺伝子であると考えられる。

【0060】

【発明の効果】以上述べたように、この発明によれば、ヒト新規K⁺チャネル蛋白質をコードする遺伝子が提供された。この遺伝子はヒト脳および神経芽腫細胞の特異的な遺伝子マーカーとして利用することができる。すなわち、本発明により、神経芽腫細胞を同定するためのプローブまたはプライマーとして利用可能なDNA断片が提供された。

【0061】

【配列表】

【0062】配列番号1

配列の長さ: 393 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: タンパク質

Ile Ala Ser Ile Ala Val Leu Ala Ala Gly Ser Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ala Thr Ser Ala Leu Arg Ser Leu Arg Phe Leu Gln Ile Leu Arg Met
 195 200 205
 Ile Arg Met Asp Arg Arg Gly Gly Thr Trp Lys Leu Leu Gly Ser Val
 210 215 220
 Val Tyr Ala His Ser Lys Glu Leu Val Thr Ala Trp Tyr Ile Gly Phe
 225 230 235 240
 Leu Cys Leu Ile Leu Ala Ser Phe Leu Val Tyr Leu Ala Glu Lys Gly
 245 250 255
 Glu Asn Asp His Phe Asp Thr Tyr Ala Asp Ala Leu Trp Trp Gly Leu
 260 265 270
 Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asp Lys Tyr Pro Gln Thr Trp
 275 280 285
 Asn Gly Arg Leu Leu Ala Ala Thr Phe Thr Leu Ile Gly Val Ser Phe
 290 295 300
 Phe Ala Leu Pro Ala Gly Ile Leu Gly Ser Gly Phe Ala Leu Lys Val
 305 310 315 320
 Gln Glu Gln His Arg Gln Lys His Phe Glu Lys Arg Arg Asn Pro Ala
 325 330 335
 Ala Gly Leu Ile Gln Ser Ala Trp Arg Phe Tyr Ala Thr Asn Leu Ser
 340 345 350
 Arg Thr Asp Leu His Ser Thr Trp Gln Tyr Tyr Glu Arg Thr Val Thr
 355 360 365
 Val Pro Met Tyr Arg Tyr Arg Arg Arg Ala Pro Ala Thr Lys Gln Leu
 370 375 380
 Phe His Phe Leu Phe Ser Ile Cys Ser
 385 390

【0063】配列番号2

配列の長さ: 1182塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

ATG GTG CAG AAG TCG CGC AAC GGC GGC GTA TAC CCC GGC CCG AGC GGG	48
Met Val Gln Lys Ser Arg Asn Gly Gly Val Tyr Pro Gly Pro Ser Gly	
1 5 10 15	
GAG AAG AAG CTG AAG GTG GGC TTC GTG GGG CTG GAC CCC GGC GCG CCC	96
Glu Lys Lys Leu Lys Val Gly Phe Val Gly Leu Asp Pro Gly Ala Pro	
20 25 30	
GAC TCC ACC CGG GAC GGC GCG CTG CTG ATC GCC GGC TCC GAG GCC CCC	144
Asp Ser Thr Arg Asp Gly Ala Leu Leu Ile Ala Gly Ser Glu Ala Pro	
35 40 45	
AAG CGC GGC AGC ATC CTC AGC AAA CCT CGC GCG GGC GGC GCG GGC GCC	192
Lys Arg Gly Ser Ile Leu Ser Lys Pro Arg Ala Gly Gly Ala Gly Ala	
50 55 60	
GGG AAG CCC CCC AAG CGC AAC GCC TTC TAC CGC AAG CTG CAG AAT TTC	240
Gly Lys Pro Pro Lys Arg Asn Ala Phe Tyr Arg Lys Leu Gln Asn Phe	
65 70 75 80	
CTC TAC AAC GTG CTG GAG CGG CCG CGC GGC TGG GCG TTC ATC TAC CAC	288
Leu Tyr Asn Val Leu Glu Arg Pro Arg Gly Trp Ala Phe Ile Tyr His	
85 90 95	

GCC TAC GTG TTC CTC CTG GTT TTC TCC TGC CTC GTG CTG TCT GTG TTT	336
Ala Tyr Val Phe Leu Leu Val Phe Ser Cys Leu Val Leu Ser Val Phe	
100 105 110	
TCC ACC ATC AAG GAG TAT GAG AAG AGC TCG GAG GGG GCC CTC TAC ATC	384
Ser Thr Ile Lys Glu Tyr Glu Lys Ser Ser Glu Gly Ala Leu Tyr Ile	
115 120 125	
CTG GAA ATC GTG ACT ATC GTG GTG TTT GGC GTG GAG TAC TTC GTG CGG	432
Leu Glu Ile Val Thr Ile Val Val Phe Gly Val Glu Tyr Phe Val Arg	
130 135 140	
ATC TGG GCC GCA GGC TGC TGC TGC CGG TAC CGT GGC TGG AGG GGG CGG	480
Ile Trp Ala Ala Gly Cys Cys Cys Arg Tyr Arg Gly Trp Arg Gly Arg	
145 150 155 160	
CTC AAG TTT GCC CGG AAA CCG TTC TGT GTG ATT GAC ATC ATG GTG CTC	528
Leu Lys Phe Ala Arg Lys Pro Phe Cys Val Ile Asp Ile Met Val Leu	
165 170 175	
ATC GCC TCC ATT GCG GTG CTG GCC GCC GGC TCC CAG GGC AAC GTC TTT	576
Ile Ala Ser Ile Ala Val Leu Ala Ala Gly Ser Gln Gly Asn Val Phe	
180 185 190	
GCC ACA TCT GCG CTC CGG AGC CTG CGC TTC CTG CAG ATT CTG CGG ATG	624
Ala Thr Ser Ala Leu Arg Ser Leu Arg Phe Leu Gln Ile Leu Arg Met	
195 200 205	
ATC CGC ATG GAC CGG CGG GGA GGC ACC TGG AAG CTG CTG GGC TCT GTG	672
Ile Arg Met Asp Arg Arg Gly Gly Thr Trp Lys Leu Leu Gly Ser Val	
210 215 220	
GTC TAT GCC CAC AGC AAG GAG CTG GTC ACT GCC TGG TAC ATC GGC TTC	720
Val Tyr Ala His Ser Lys Glu Leu Val Thr Ala Trp Tyr Ile Gly Phe	
225 230 235 240	
CTT TGT CTC ATC CTG GCC TCG TTC CTG GTG TAC TTG GCA GAG AAG GGG	768
Leu Cys Leu Ile Leu Ala Ser Phe Leu Val Tyr Leu Ala Glu Lys Gly	
245 250 255	
GAG AAC GAC CAC TTT GAC ACC TAC GCG GAT GCA CTC TGG TGG GGC CTG	816
Glu Asn Asp His Phe Asp Thr Tyr Ala Asp Ala Leu Trp Trp Gly Leu	
260 265 270	
ATC ACG CTG ACC ACC ATT GGC TAC GGG GAC AAG TAC CCC CAG ACC TGG	864
Ile Thr Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asp Lys Tyr Pro Gln Thr Trp	
275 280 285	
AAC GGC AGG CTC CTT GCG GCA ACC TTC ACC CTC ATC GGT GTC TCC TTC	912
Asn Gly Arg Leu Leu Ala Ala Thr Phe Thr Leu Ile Gly Val Ser Phe	
290 295 300	
TTC GCG CTG CCT GCA GGC ATC TTG GGG TCT GGG TTT GCC CTG AAG GTT	960
Phe Ala Leu Pro Ala Gly Ile Leu Gly Ser Gly Phe Ala Leu Lys Val	
305 310 315 320	
CAG GAG CAG CAC AGG CAG AAG CAC TTT GAG AAG AGG CGG AAC CCG GCA	1008
Gln Glu Gln His Arg Gln Lys His Phe Glu Lys Arg Arg Asn Pro Ala	
325 330 335	
GCA GGC CTG ATC CAG TCG GCC TGG AGA TTC TAC GCC ACC AAC CTC TCG	1056
Ala Gly Leu Ile Gln Ser Ala Trp Arg Phe Tyr Ala Thr Asn Leu Ser	
340 345 350	
CGC ACA GAC CTG CAC TCC ACG TGG CAG TAC TAC GAG CGA ACG GTC ACC	1104
Arg Thr Asp Leu His Ser Thr Trp Gln Tyr Tyr Glu Arg Thr Val Thr	

```

          355          360          365
GTG CCC ATG TAC AGG TAC CGC CGC CGG GCA CCT GCC ACC AAG CAA CTG 1152
Val Pro Met Tyr Arg Tyr Arg Arg Ala Pro Ala Thr Lys Gln Leu
          370          375          380
TTT CAT TTT TTA TTT TCC ATT TGT TCT TAA 1182
Phe His Phe Leu Phe Ser Ile Cys Ser ***
          385          390

```

【0064】配列番号3

配列の長さ: 177 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

```

CGCGGAGCGA GGTGGCCGCA GCGTCTCGC GCGCGGCCA AGCCCGGCAG GAGTGGCGAA 60
CGCGCGCCTC GGCCATGCGG CTCCCGGCCG GGGGGCCTGG GCTGGGGCCC GCGCGCCCC 120
CGCGGCTCCG CCCCCGCTGA GCCTGAGCCC GACCCGGGGC GCCTCCGCCC AGGCACC 177

```

【0065】配列番号4

配列の長さ: 89塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

```

ACCCCACTTT TTGTTGTTCA TTATTTTGAT TGATTTTTTT TCTTTAAAT GTATTTTCA 60
CAAAGGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 89

```

【0066】配列番号5

配列の長さ: 255塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA

配列

```

GATCCAGTCG GCCTGGAGAT TCTACGCCAC CAACCTCTCG CGCACAGACC TGCCTCCAC 60
GTGGCAGTAC TACGAGCGAA CGGTCACOGT GCCCATGTAC AGGTACCGCC GCCGGGCACC 120
TGCCACCAAG CAACTGTTTC ATTTTATTAT TTCCATTGT TCTTAAACCC CACTTTTGT 180
TGTTCAATAT TTTGATTGAT TTTTCTTCT TAAATGTAT TTTTCACAAA GGAAAAAAAA 240
AAAAAAAAA AAAAA 255

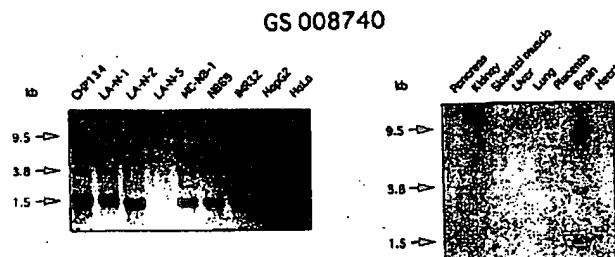
```

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒト細胞株およびヒト各臓器におけるGS008740遺伝子の発現を調べるためのノーザン分析の結果を示す図である。

【図2】 図2は、本発明の遺伝子がコードする蛋白質の一次構造が、膜電位依存性K⁺チャンネルに關与する蛋白質に特徴的であることを示す図である。

【図1】



【図2】

MVQKSRNGGV YPGPSGEKKL KVGfVGLDPG APDSTRDGAL LIAGSEAPKR 50

GSILSKPRAG GAGAGKPPKR NAFYRKLQNF LYNVLERPRG WAFIYHAYVF 100

S1 S2
LLVFSCLVLS VFSTIKBYEK SSEGALYILE IVTIVVFGVE YFVRIWAAGC 150

S3
CCRYRGWRGR LKFARKPFCV IDIMVLIASI AVLAAGSQGN VFATSALRSL 200
+

S4 S5
RFLQILRMIR MDRRGGTWKL LGSVVYAHSK ELVTAWYIGF ECLILASFLV 250
+ + + +

H5
YLAEKGENDH FDTYADALWW GLITLTTIGY GDKYPQTWNG RLLAATFTLI 300

S6
GVSFFALPAG ILGSGFALKV QEQRQKHFE KRRNPAAGLI QSAWRFYATN 350

LSRTDLHSTW QYYERTVTVP MYRYRRRAPA TKQLFHFLPS ICS 393

【手続補正書】

【提出日】平成8年4月24日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ヒト細胞株およびヒト各臓器におけるGS008740遺伝子の発現を調べるためのノーザン分析の結果を示す電気泳動写真である。

【図2】図2は、本発明の遺伝子がコードする蛋白質の一次構造が、膜電位依存性K⁺チャネルに關与する蛋白質に特徴的であることを示す図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

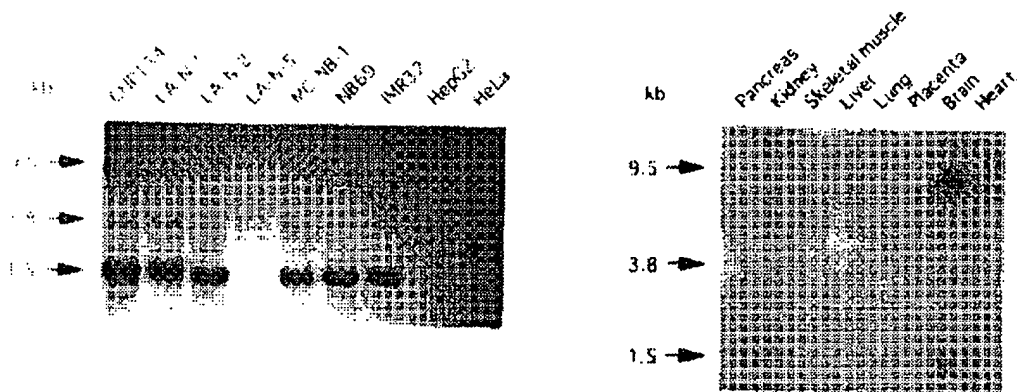
【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

GS 008740



図面代用写真

フロントページの続き

(72)発明者 大久保 公策
 大阪府吹田市山田丘1-3 大阪大学 細
 胞生体工学センター内